

## 原 著

低出力超音波パルスを照射したヒト歯槽骨骨膜由来細胞  
スフェロイドの組織学的変化

川津布美<sup>\*1</sup>, 東 一善<sup>\*2</sup>, 根本賢治<sup>\*1</sup>  
高橋 理<sup>\*2</sup>, 出口眞二<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>神奈川歯科大学大学院歯学研究科歯周組織再生学講座

<sup>\*2</sup>神奈川歯科大学大学院歯学研究科神経組織発生学講座

(受付日：2013年6月11日 受理日：2013年8月14日)

Histological Changes of Human Alveolar Bone Periosteal Cell Spheroids Upon  
Exposure to Low-intensity Pulsed Ultrasound

Fumi Kawatsu<sup>\*1</sup>, Kazuyoshi Higashi<sup>\*2</sup>, Kenji Nemoto<sup>\*1</sup>  
Osamu Takahashi<sup>\*2</sup> and Shinji Deguchi<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup>Department of Periodontal Regeneration, Kanagawa Dental University Graduate School

<sup>\*2</sup>Department of Neuroanatomy, Histology and Embryology, Kanagawa Dental University Graduate School

(Received : June 11, 2013 Accept : August 14, 2013)

**Abstract** : We have reported that low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) accelerated periodontal wound healing in experimental alveolar bone defects in dogs, however, the exact mechanism is unknown. Herein, we attempted to determine how daily LIPUS stimulation might affect the cell form and bone matrix protein expression in spheroids of human alveolar bone periosteal cells. Histological (toluidine blue) and immunohistochemical analyses (osteopontin (OP) and osteocalcin (OC)) of spheroids were conducted after 1, 3, 7, and 14 days of culture with daily LIPUS stimulation. Layered structures, distinguished by the directionality of the cells, were observed in the spheroids from day 1, with the layered structures becoming indistinct over time in the order of the irradiated side, non-irradiated side, and control. Immunohistochemical reactions indicating OP and OC production were observed in the order of the core, middle layer, and outer layer of the spheroids. Furthermore, positive reactions of OC and OP were seen over time in the order of the irradiation side, non-irradiation side, and controls. In addition, funicular structures were observed in the core from the outer layer of the spheroids on the irradiated side from day 1. These findings show that LIPUS irradiation promotes cell differentiation and changes the cell direction within spheroids.

連絡先：川津布美

〒238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町82番地

神奈川歯科大学大学院歯学研究科歯周組織再生学講座

Fumi Kawatsu

Department of Periodontal Regeneration, Kanagawa Dental University Graduate School

82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa, 238-8580, Japan

E-mail : kawatsu@kdu.ac.jp

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 55(4) : 312-325, 2013.

**Key words** : Low-intensity pulsed ultrasound, spheroid, human alveolar bone periosteal cells

**要旨** : 我々は、イヌの実験的骨欠損部に低出力超音波パルス (LIPUS) を照射すると、歯周組織の治癒が促進されることを報告した。しかし、その詳細なメカニズムは明らかでないため、今回は、ヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) の細胞凝集塊 (スフェロイド) を作製して LIPUS を照射し、スフェロイド内の細胞形態および骨基質タンパク発現に与える LIPUS の影響を経時的に検索した。1 日, 3, 7, および 14 日間, LIPUS を照射したスフェロイドに対し、トルイジンブルーを用いた組織学的検索と、抗オステオポンチン (OP), 抗オステオカルシン (OC) を用いた免疫組織化学的検索を行ったところ、1 日目から細胞の走行などにより区別された層構造がスフェロイドに認められたが、照射近位部、照射遠位部、コントロールの順で経時的に層構造は不明瞭になっていった。また、全てのスフェロイドに深層から中層、表層の順で OP と OC 免疫陽性反応が認められた。経時的には、照射近位部、照射遠位部、コントロールの順に、OP, OC 免疫陽性反応が認められ、照射近位部では 1 日目よりスフェロイドの表層から深層へ向けて索状構造が観察された。これらの結果から、LIPUS 照射の影響が大きい照射近位部で早期に OP, OC の発現と索状構造が認められたため、LIPUS 照射により、スフェロイド内の HABPCs の細胞分化の促進と細胞の方向性の変化が起こることが示唆された。

日本歯周病学会会誌 (日歯周誌) 55(4) : 312-325, 2013

**キーワード** : 低出力超音波パルス, スフェロイド, ヒト歯槽骨骨膜由来細胞

## 緒 言

近年、超音波を用いた様々な研究が行われ、その結果、臨床の場においても利用されている<sup>1-3)</sup>。超音波療法は物理学的療法の一つであり、超音波を用いることにより温熱効果あるいは非温熱効果によりタンパク合成やサイトカイン産生が促されていることが報告されている<sup>4-7)</sup>。超音波療法の中でも低出力超音波パルス (LIPUS) は、微弱な超音波エネルギーを応用した治療法である<sup>8,9)</sup>。LIPUS の出力は温熱効果を与える出力範囲 (1~3 W/cm<sup>2</sup>) や<sup>1,10)</sup>、日本超音波医学会により示された生体に何らかの影響を及ぼす超音波強度の最低値 (240 mW/cm<sup>2</sup>) よりも低いため、低侵襲で非温熱効果を有するものと考えられる<sup>11,12)</sup>。LIPUS の効果は、ウサギ腓骨骨折後の治癒および大腿骨骨欠損の修復に対し、1983 年に Duarte により初めて報告された<sup>13)</sup>。その後、LIPUS 照射は、ラットの大腿骨骨折に対する治癒促進効果や、脛骨皮下骨折、撓骨遠位端骨折に対して治癒期間の短縮に有効であることが報告されている<sup>14-16)</sup>。さらに、LIPUS 照射はウサギの下顎骨骨折モデルの研究でも治癒促進効果が報告されている<sup>17)</sup>。そのため、現在 LIPUS 照射は骨折治癒に効率的な治療法として整形外科領域にて応用されている<sup>10,18)</sup>。

一方、歯科領域では、インプラント治療において骨形成促進効果を目的とした LIPUS 照射を行った臨床応用研究が多数報告されている<sup>19-22)</sup>。このように

LIPUS は臨床の場において既に利用されているが、LIPUS 照射を受けた細胞の動態については不明瞭な点が多く、それゆえ、現在でも LIPUS を用いた基礎的研究が多数報告されている。LIPUS を用いた *in vitro* の研究では、LIPUS を照射することにより LIPUS の刺激がインテグリンなどの細胞接着因子を介して、細胞にシグナル伝達されていると考えられている<sup>11,23,24)</sup>。その結果として、骨芽細胞に LIPUS 照射を行うとシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) を介してプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生が増加することが報告されており<sup>25-27)</sup>、その他にも Runx2, I 型コラーゲン, オステオネクチン (ON) オステオポンチン (OP), オステオカルシン (OC) の合成が上昇すると報告されており<sup>28-34)</sup>、歯根膜細胞でも I 型コラーゲン, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇が報告されている<sup>35)</sup>。また、伊海らは、ビーグル犬の下顎骨骨欠損モデルに対し LIPUS 照射が接合上皮の根尖側移動を抑制し、新生セメント質および新生骨の再生が観察されたことを報告している<sup>36)</sup>。真野らは LIPUS 照射がヒト歯槽骨骨膜由来細胞 (HABPCs) に対し、細胞増殖に影響を与えず ALP 活性を上昇させたことを報告している<sup>37)</sup>。以前の我々の研究において、平面培養と比較して細胞の分化誘導に有用なスフェロイドを HABPCs にて作製し LIPUS 照射を行ったところ、コントロールと比較して早期に骨基質タンパクが発現されることを報告した<sup>38)</sup>。しかし、スフェロイド内の細胞分化時期に差異は認められたが、LIPUS の照射方向が規定されておらず、スフェロイド

の一定部位に持続的に照射されていなかったため、骨基質タンパク発現と LIPUS の照射強度の関係については明らかではなかった。

これらの点を考慮して、本研究ではスフェロイドの位置を固定することで LIPUS 照射方向を規定し、スフェロイド内の細胞の形態変化と細胞分化への影響を明らかにすることを目的として、トルイジンブルーによる組織学的検索と、骨芽細胞のマーカーとして広く用いられており骨のリモデリングやメカニカルストレスの調整に関わる骨基質タンパクである OP および成熟した骨芽細胞に認められる非コラーゲン性タンパク質である OC の発現を免疫組織化学的に検索した。

## 材料と方法

### 1. 細胞培養

使用した歯槽骨骨膜由来細胞は、神奈川歯科大学倫理委員会の承認（認証番号第 178 番）のもと、神奈川歯科大学附属病院に来院したインフォームドコンセントの得られた患者より得た。骨膜組織は歯周外科処置時に部分層弁にて肉肉剥離を行った歯槽骨表面に存在する骨膜組織を 2.0×2.0 mm 程度採取した。採取した骨膜組織は、10% ウシ胎児血清 (FCS), 0.25 mM L-ascorbic acid-2-phosphate (WAKO, 大阪) および 10 units/ml penicillin (Gibco, USA), 10 μg/ml streptomycin (Gibco, USA), 3.5 mg/ml D (+) -glucose (WAKO, 大阪) の最終濃度になるようそれぞれを添加した α-Minimum Essential Medium (α-MEM: Gibco, USA) にて洗浄後、メスを用いて細分化させ 24 well culture dish 上に播種し、前述の培地中で Cell culture slip (Thermanox Plastic, Nalge Nunc International, USA) にて組織片を押さえ 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下においてインキュベータ内にて静置した。これらの組織片から遊走してきた細胞を HABPCs の初代培養細胞とした。HABPCs はコンフルエントに達した後、0.25% Trypsin (Difco, USA) / PBS (-) (Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free phosphate buffered saline, 日水製薬, 東京) で剥離し、細胞密度を 1.8×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> に調整した後、100 mm culture dish 中で前述の培地を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下においてインキュベータ内で継代培養を行った。培地交換を 2 日ごとに行い、継代培養を繰り返した。本研究では、第 5 代の培養 HABPCs を使用した。なお、本研究はヘルシンキ宣言を遵守して行った。

### 2. スフェロイド作製

HABPCs を 1.8×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度にて 100

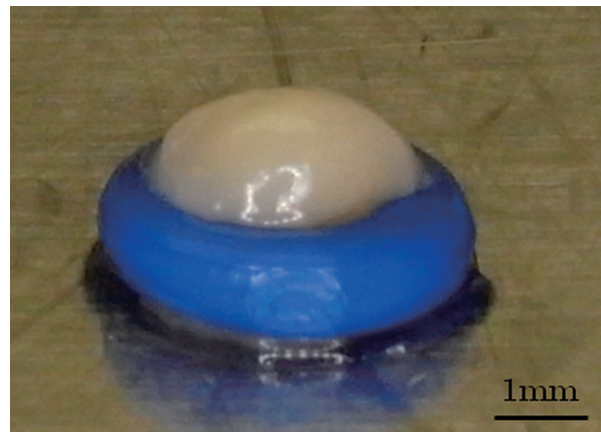


図1 Oリングにて位置固定したスフェロイド  
スフェロイド形成後1日目。

mm culture dish 中に播種し、2 日ごとの培地交換を行い 10 日間培養した。10 日後、HABPCs を 100 mm culture dish から 0.25% Trypsin にてシート状のまま剥離した。剥離したシートは 300 G で 3 分間遠心沈殿し、球状にしたものを培地中にて 24 時間静置し、スフェロイドとした。

### 3. LIPUS 照射

本実験の LIPUS 照射装置にはプローブ先端の直径が 1.8 cm の円形の振動子にて構成されている BR ソニック-Pro (伊藤超短波, 東京) を用いた。24 well culture dish にスフェロイドを矯正用 Oリングにて位置固定しながら静置し、内部には前述の培地を満たした。dish 底部に振動子を設置し (図 1), 振動子と dish 底部には LIPUS の良導体であるジェルを塗布した。照射条件は周波数を 1 MHz, パルス周波数 100 Hz, 出力は 178 mW/cm<sup>2</sup> とし、1 日, 3, 7 および 14 日間、毎日 15 分間照射を行った。LIPUS を照射したスフェロイドの振動子に近い部位を照射近位部、振動子から遠い部位を照射遠位部、照射していないものをコントロールとした (図 2)。

### 4. 組織学的検索

LIPUS 照射を行ったスフェロイドは、PBS (-) にて 3 回洗浄し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.3) で 2.5% に希釈したグルタルアルデヒド液 (Wako, 大阪) 中で 90 分間固定した後にスフェロイドに割を入れ、さらに 2.5% グルタルアルデヒド液にて 30 分間固定を行った。その後、0.1 M リン酸緩衝液にて 3 回洗浄し、1% オスミウム酸液 (Wako, 大阪) で 90 分間固定し、漸次エタノール系列で脱水した。さらに試料は酸化プロピレン (Wako, 大阪) を介して Quetol 651 樹脂

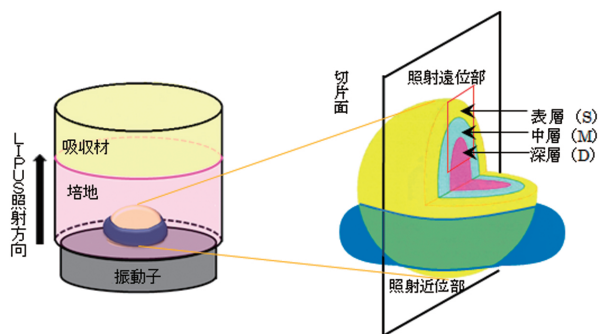


図2 LIPUS照射時およびスフェロイドの模式図

スフェロイドは振動子に近い部位を照射近位部、振動子から遠い部位を照射遠位部とした。スフェロイドの外側から細胞の形状、走行などにより、表層(S)、中層(M)、深層(D)に区別された。赤枠は照射遠位部を例として実際に観察した部位を示す。

(Electron Microscopy Sciences, USA) に包埋した。包埋した試料はMT-1型ウルトラミクロトームにて、ガラスナイフを用いて約 $1\mu\text{m}$ の厚切り切片を作製した。その試料に0.05% トルイジンブルーによる染色を施して、光学顕微鏡(BZ-8000, KEYENCE, 大阪)にて確認した。

## 5. 免疫組織化学的検索

LIPUSを照射したスフェロイドをPBS(-)にて3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド緩衝溶液(WAKO, 大阪)で $4^{\circ}\text{C}$ にて12時間固定を行った。その後、液体窒素にて凍結させ、O.C.T. compound (Tissue-Tek, SAKURA, 大阪)に包埋し、凍結ミクロトーム(クリオスタットHM500-OM, カールツァイス, 東京)にて厚さ約 $25\mu\text{m}$ の切片を作製した。切片をPBS(-)にて洗浄後、10%正常ヤギ血清(NGS)で30分間Blockingした。10%NGSにてマウスモノクローナル抗OP抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA)、ラビットポリクローナル抗OC抗体(Santa Cruz Biotechnology, USA)を希釈し、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩作用させた。PBS(-)にて2回洗浄後、OPに対する二次抗体および標識物質として抗マウスAlexa 488(DAKO, Denmark)とOCに対する二次抗体として抗ウサギIgGピオチン標識(Life technology, USA)を1時間作用させた。その後、PBS(-)にて2回洗浄し、OCに対する標識物質としてCy-3(SIGMA, USA)を1時間作用させた。また、1, 3, 7, 14日目のスフェロイドの切片へ同様の二次抗体および標識物質を1時間作用させ、ネガティブコントロールとした。その後、PBS(-)にて2回洗浄し、グリセリンを用いて封入し、共焦点レーザー顕微鏡(Nikon E800, Nikon, 東京)にて

観察を行った。

## 6. 統計分析

本研究では、共焦点レーザー顕微鏡にて観察したコントロール、照射遠位部、照射近位部それぞれの免疫染色像において、5箇所 $50\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$ の範囲を任意に選択し( $n=4$ , 計20箇所)、画像解析ソフトImage J(Ver.1.46: U.S. National Institutes of Health, USA)を用いて免疫陽性反応範囲を計測した。得られた免疫陽性反応範囲は全範囲にて除し、その値を平均化することにより各々の免疫陽性反応率とした。それらをDr.SPSS II(11.0.1, SPSS, 東京)を用いて一元配置分散分析(analysis of variance: ANOVA)およびScheffe検定を行い、データは平均 $\pm$ 標準偏差で示し、 $P<0.05$ を有意水準とした。

## 結 果

### 1. トルイジンブルー染色を施した組織学的所見

#### 1) コントロール

1日目の組織像では細胞の形状や走行、分布密度により3層に区別されたが、その境界はやや不明瞭であった。細胞の形状は最表層では扁平形で、表層および中層では紡錘形、深層では星状から卵円形を呈していた。細胞の分布密度は深層に向かって高くなっていた(図3a)。3日目では細胞の形状や走行、分布密度により3層は明瞭に区別された。最表層の細胞は扁平形で、表層の細胞は桿状形、中層の細胞はやや大型な桿状形、深層の細胞は星状から卵円形を呈していた。細胞の分布密度は深層に向かって高くなっていた(図3b)。7日目では細胞の形状や走行、分布密度により、3層に明瞭に区別された。最表層の細胞は厚みを持った扁平形を呈し、表層の細胞は紡錘形、中層の細胞は一部が星状形で他の細胞は卵円形、深層ではやや大型の星状形や卵円形を呈していた。細胞の分布密度は深層に向かって高くなっていた(図3c)。14日目では細胞の形状や走行、分布密度により3層に区別されたが、その境界は不明瞭であった。細胞の形状は最表層では扁平形で、その他の細胞は球から卵円形を呈していた。細胞の分布密度は差異がほとんど認められなかった(図3d)。また、表層から深層に向かって細胞の長軸方向に向けた細胞の配列すなわち索状構造は認められなかった。さらに、スフェロイドの大きさに経時的変化はほとんど認められなかった。

#### 2) 照射遠位部

1日目では細胞の形状や走行、分布密度により3層に区別されたが、その境界はやや不明瞭であった。細

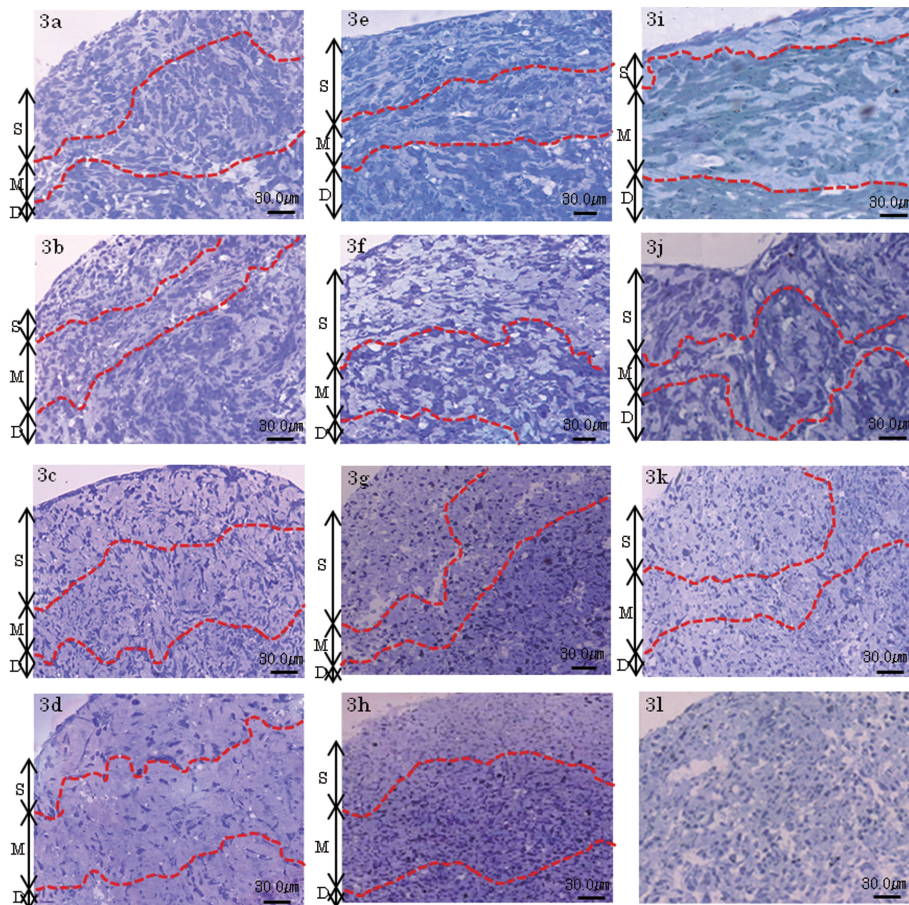


図3 トルイジンブルー染色像

コントロール (a) 1日目, (b) 3日目, (c) 7日目, (d) 14日目を示す。

照射遠位部 (e) 1日目, (f) 3日目, (g) 7日目, (h) 14日目を示す。

照射近位部 (i) 1日目, (j) 3日目, (k) 7日目, (l) 14日目を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

胞の形状は最表層では扁平形で、表層では桿状形、中層では星状形から卵円形、深層では卵円形を呈していた。細胞の分布密度は深層に向かって高くなっていた(図3e)。3日目では細胞の形状や走行、分布密度により層構造が3層に明瞭に区別された。細胞の形状は最表層では厚みを持った扁平形で、表層では桿状形、中層では星状形から卵円形、深層では卵円形を呈していた。細胞の分布密度は中層で高くなっていた(図3f)。7日目では細胞の形状や走行、細胞の分布密度により3層に区別されたが、その境界は不明瞭であった。最表層の細胞は扁平形で、表層、中層の細胞は卵円形、深層の細胞は大型な卵円形を呈していた。細胞の分布密度は順次深層で高くなった(図3g)。14日目では細胞の走行、分布密度により3層に区別されたが、その境界は不明瞭であった。細胞の形状は最表層では扁平形を呈し、その他の細胞は球形に近い卵円形を呈して

いた。細胞の分布密度は中層で高くなっていた(図3h)。また、3日目にのみ索状構造が表層から中層付近にまで認められたが、深層では不明瞭であった(図3e)。さらに、スフェロイドの大きさに経時的変化はほとんど認められなかった。

### 3) 照射近位部

1日目では細胞の形状や走行、分布密度により層構造が最表層側より表層、中層、深層の3層に明瞭に区別された。最表層の細胞は厚みを持った扁平形で、表層の細胞は紡錘形、中層および深層の細胞は桿状形を呈していた。細胞の分布密度は深層に向かうにつれ高くなっていた(図3i)。3日目では細胞の形状や走行、分布密度により層構造が最表層側より表層、中層、深層の3層に明瞭に区別された。最表層の細胞は厚みを持った扁平形で、表層の細胞は紡錘形、中層および深層の細胞は桿状形を呈していた。細胞の分布密度は深

表1 OP免疫陽性反応率

|    |        | 1日目            | 3日目            | 7日目            | 14日目            |
|----|--------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| 表層 | コントロール | 0.01 ± 0.02    | 0.05 ± 0.03    | 5.73 ± 2.53    | 44.37 ± 10.23‡  |
|    | 照射遠位部  | 0.01 ± 0.02    | 0.99 ± 1.04    | 22.43 ± 8.02*‡ | 31.15 ± 7.43‡   |
|    | 照射近位部  | 1.50 ± 0.96*†  | 15.19 ± 4.95*† | 1.98 ± 0.42    | 0.60 ± 0.41     |
| 中層 | コントロール | 0.03 ± 0.03    | 0.23 ± 0.39    | 18.28 ± 9.51‡  | 32.27 ± 10.95‡  |
|    | 照射遠位部  | 0.01 ± 0.04    | 2.30 ± 1.61    | 21.16 ± 9.66‡  | 23.21 ± 7.27‡   |
|    | 照射近位部  | 1.14 ± 1.12    | 16.08 ± 2.85*† | 0.99 ± 0.73    | 0.67 ± 0.71     |
| 深層 | コントロール | 0.00 ± 0.01    | 2.42 ± 1.08    | 22.71 ± 7.20‡  | 28.17 ± 13.51†‡ |
|    | 照射遠位部  | 0.06 ± 0.07    | 16.25 ± 5.49*‡ | 21.68 ± 8.62‡  | 1.34 ± 0.38     |
|    | 照射近位部  | 14.21 ± 9.22*† | 6.00 ± 5.30    | 0.20 ± 0.25    | 0.19 ± 0.22     |

\*コントロールに対する有意差(P&lt;0.05)

†照射遠位部に対する有意差(P&lt;0.05)

‡照射近位部に対する有意差(P&lt;0.05)

(平均 ± 標準偏差)

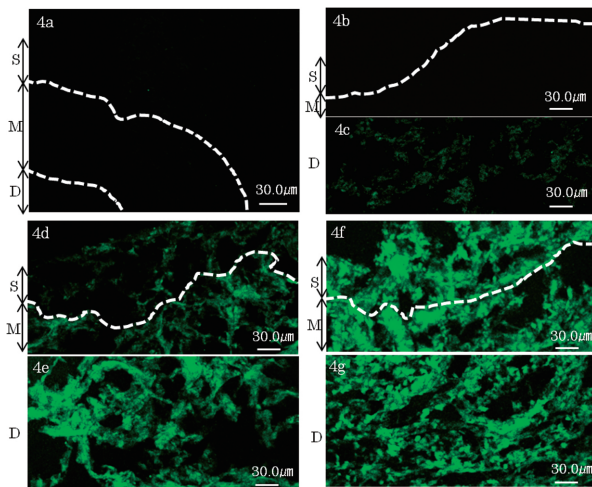


図4 コントロールのOP免疫組織化学染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層と中層, (e) 7日目の深層, (f) 14日目の表層と中層, (g) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

層に向かうにつれ高くなっていった (図 3j)。7日目では細胞の走行や分布密度により3層に区別されたが、その境界は不明瞭であった。最表層の細胞では扁平形を呈していたが、その他の細胞は球状から卵円形を呈していたため、細胞の形状にほとんど差異は認められなかった。細胞の分布密度は中層でやや高くなっていった (図 3k)。14日目ではスフェロイド全層にわたって細胞の形状や走行、分布密度に差異は認められなかった。細胞の形状は最表層の細胞のみ扁平形を呈し、その他は球形を呈していた (図 3l)。また、索状構造は1日目で表層付近の一部分に認められた (図 13a)。3日目では表層から中層付近にまで明瞭な索状構造が多数

認められたが、深層では不明瞭であった (図 13c)。7, 14日目での組織像では索状構造は認められなかった。さらに、スフェロイドの大きさに経時の変化はほとんど認められなかった。

## 2. OP免疫組織化学的所見

### 1) コントロール

1日目ではOP免疫反応は、スフェロイド全域の細胞で陰性を示し (図 4a)、3日目では深層にのみOP免疫陽性反応が一部の細胞に認められた (図 4b,c)。7日目ではOP免疫陽性反応が表層、中層で一部の細胞に認められ、深層では全ての細胞に認められた (図 4d,e)。14日目ではOP免疫陽性反応が3層で全ての細胞に顕著に認められた (図 4f,g)。また、7日目では中層、深層で照射近位部と比較し有意に高いOPの発現が認められた。14日目では深層で照射遠位部と比較し有意に高いOPの発現が認められ、全層で照射近位部に対し有意に高いOPの発現が認められた。(表1)。

### 2) 照射遠位部

1日目ではコントロールと同様にOP免疫反応は全層にわたって陰性を示した (図 5a)。3日目ではOP免疫陽性反応は表層の一部の細胞に認められ、中層で全ての細胞に認められた。深層では全ての細胞に顕著に認められた (図 5b,c)。7日目ではOP免疫陽性反応が表層、中層で全ての細胞に認められ、深層では全ての細胞に顕著に認められた (図 5d,e,f)。14日目ではOP免疫陽性反応が表層、中層で全ての細胞に顕著に認められ、深層では散在的に認められた (図 5g,h,i)。また、3日目では深層でコントロール、照射近位部と比較し有意に高いOPの発現が認められた。7日目では表層でコントロールと比較し有意に高いOPの発現が認められ、全層で照射近位部と比較し有意に高いOPの発現が認められた。14日目では表層、中層でコ

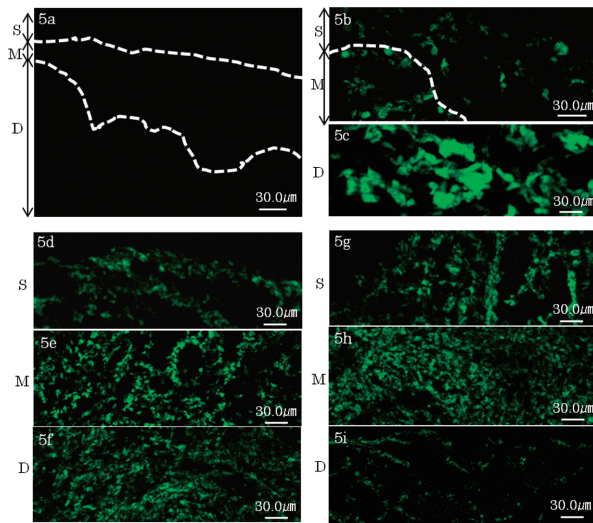


図5 照射遠位部のOP免疫組織化学染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層, (e) 7日目の中層, (f) 7日目の深層, (g) 14日目の表層, (h) 14日目の中層, (i) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

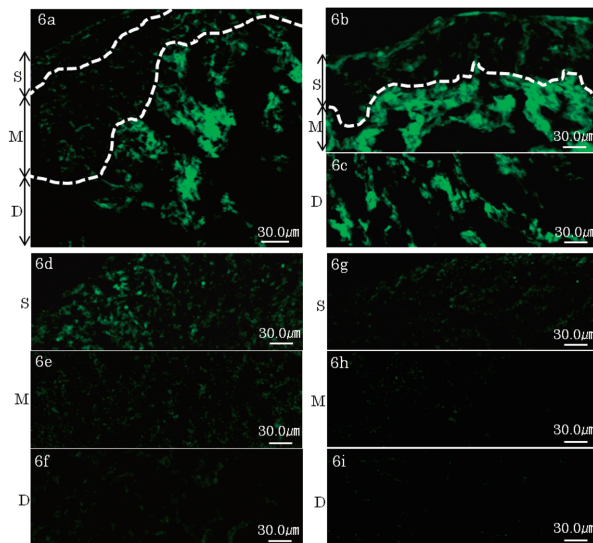


図6 照射近位部のOP免疫組織化学染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層, (e) 7日目の中層, (f) 7日目の深層, (g) 14日目の表層, (h) 14日目の中層, (i) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

コントロールと比較し有意に高いOPの発現が認められた(表1)。

### 3) 照射近位部

1日目ではOP免疫陽性反応が表層, 中層では一部

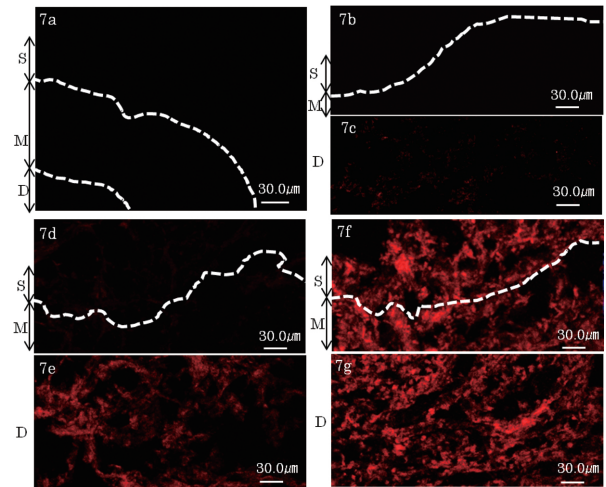


図7 コントロールのOC免疫組織化学染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層と中層, (e) 7日目の深層, (f) 14日目の表層と中層, (g) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

の細胞に認められ, 深層では全ての細胞に認められた(図6a)。3日目ではOP免疫陽性反応が, 表層, 中層では全ての細胞に顕著に認められ, 深層では散在的に認められた(図6b,c)。7日目ではOP免疫陽性反応は表層の一部の細胞に認められ, 中層, 深層ではほとんど認められなかった(図6d,e,f)。14日目では免疫染色像ではOP免疫陽性反応が表層相当部では散在的に認められたが, 中層相当部, 深層相当部ではほとんど認められなかった(図6g,h,i)。また, 1日目では表層, 深層でコントロール, 照射遠位部と比較し有意に高いOPの発現が認められ, 3日目では同様に表層, 中層で有意に高いOPの発現が認められた(表1)。

## 3. OC免疫組織化学的所見

### 1) コントロール

1日目ではOC免疫反応は, スフェロイド全域の細胞で陰性を示した(図7a)。3日目では表層, 中層でOC免疫反応はいずれも陰性を示したが, 深層ではOC免疫陽性反応が一部の細胞にわずかに認められた(図7b,c)。7日目ではOC免疫陽性反応が表層, 中層で認められず, 深層で全ての細胞に認められた(図7d,e)。14日目ではOC免疫陽性反応もOP免疫陽性反応と同様に3層において全域の細胞に顕著に認められた(図7f,g)。また, 14日目の深層では照射遠位部, 照射近位部と比較し有意に高いOCの発現が認められた(表2)。

### 2) 照射遠位部

表2 OC 免疫陽性反応率

|    |        | 1日目         | 3日目            | 7日目            | 14日目           |
|----|--------|-------------|----------------|----------------|----------------|
| 表層 | コントロール | 0.02 ± 0.29 | 0.11 ± 0.16    | 0.01 ± 0.02    | 28.75 ± 23.67  |
|    | 照射遠位部  | 0.01 ± 0.02 | 0.05 ± 0.09    | 13.32 ± 6.50*‡ | 26.21 ± 8.04   |
|    | 照射近位部  | 1.28 ± 2.56 | 21.93 ± 5.83*† | 5.11 ± 1.56    | 2.32 ± 2.69    |
| 中層 | コントロール | 0.02 ± 0.03 | 0.08 ± 0.10    | 0.02 ± 0.03    | 22.65 ± 18.83  |
|    | 照射遠位部  | 0.00 ± 0.01 | 0.04 ± 0.05    | 16.96 ± 11.29* | 29.02 ± 16.48  |
|    | 照射近位部  | 1.26 ± 2.52 | 13.53 ± 2.54*† | 5.16 ± 1.31    | 0.96 ± 1.68    |
| 深層 | コントロール | 0.00 ± 0.00 | 0.14 ± 0.09    | 2.60 ± 2.73    | 19.21 ± 9.23†‡ |
|    | 照射遠位部  | 0.02 ± 0.03 | 9.38 ± 4.39*‡  | 31.47 ± 2.20*‡ | 2.97 ± 1.19    |
|    | 照射近位部  | 1.25 ± 1.55 | 2.83 ± 2.20    | 0.49 ± 0.15    | 0.35 ± 0.23    |

\*コントロールに対する有意差 (P&lt;0.05)

†照射遠位部に対する有意差 (P&lt;0.05)

‡照射近位部に対する有意差 (P&lt;0.05)

(平均 ± 標準偏差)

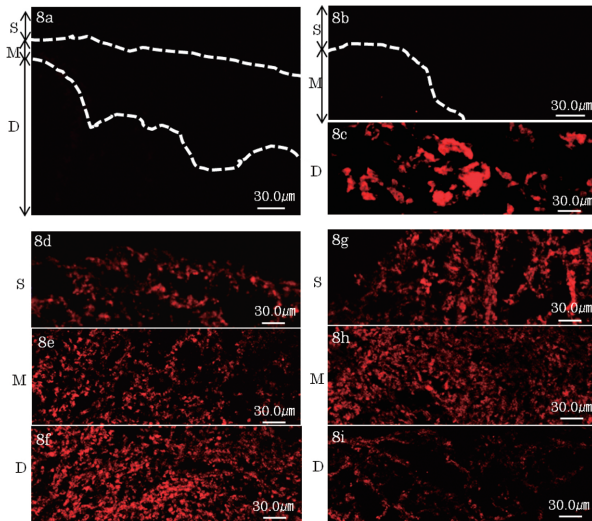


図8 照射遠位部のOC免疫組織化学染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層, (e) 7日目の中層, (f) 7日目の深層, (g) 14日目の表層, (h) 14日目の中層, (i) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

1日目ではOC免疫反応は全層にわたって陰性を示した(図8a)。3日目ではOC免疫反応は、表層、中層で陰性を示したが、深層では全ての細胞に陽性反応が顕著に認められた(図8b,c)。7日目でOC免疫陽性反応が表層、中層で全ての細胞に認められ、深層では全ての細胞に顕著に認められた(図8d,e,f)。14日目ではOC免疫陽性反応が表層、中層では全ての細胞に顕著に認められ、深層にて散在的に認められた(図8g,h,i)。また、3日目では深層でコントロール、照射近位部と比較し有意に高いOCの発現が認められた。7日目で全層でコントロールと比較し有意に高いOCの発現

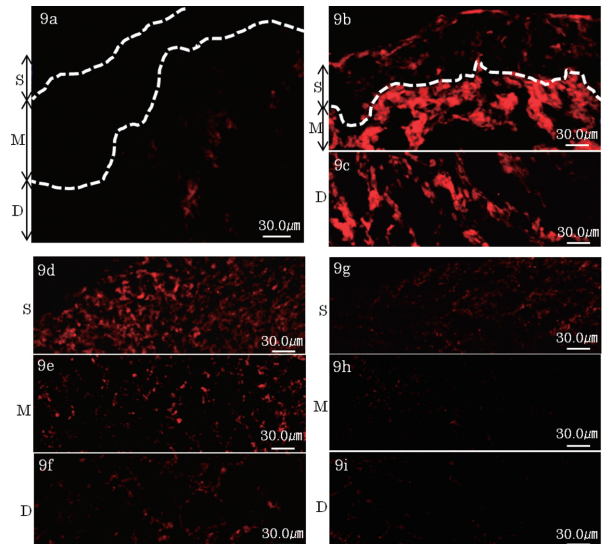


図9 照射近位部のOC免疫組織化学染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層, (e) 7日目の中層, (f) 7日目の深層, (g) 14日目の表層, (h) 14日目の中層, (i) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

が認められ、表層、深層では照射近位部と比較し有意に高いOCの発現が認められた(表2)。

## 3) 照射近位部

1日目ではOC免疫反応は表層、中層では陰性を示したが、深層では一部の細胞に陽性反応が認められた(図9a)。3日目ではOC免疫陽性反応は、OP免疫陽性反応と同様に、表層、中層では全ての細胞に顕著に認められ、深層では散在的に認められた(図9b,c)。7日目でOC免疫陽性反応は表層の一部の細胞に認められたほか、中層では散在的に、深層ではほとんど認



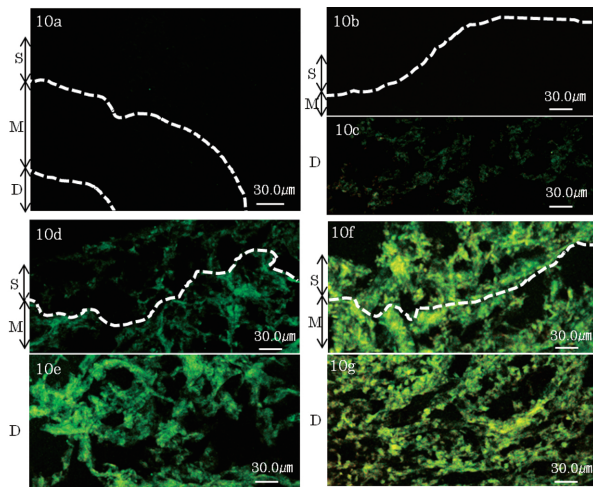


図 10 コントロールの OP および OC 免疫二重染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層と中層, (e) 7日目の深層, (f) 14日目の表層と中層, (g) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

められなかった (図 9d,e,f)。14日目では OC 免疫陽性反応が表層相当部では散在的に認められたが, 中層相当部, 深層相当部ではほとんど認められなかった (図 9g,h,i)。また, 3日目の表層, 中層でコントロール, 照射遠位部と比較し有意に高い OC の発現が認められた (表 2)。

#### 4. OP および OC 免疫二重染色を施した免疫組織化学的所見

##### 1) コントロール

1日目, 3日目では OP および OC 免疫共陽性反応は認められなかった (図 10a,b,c)。7日目では表層, 中層で OP および OC 免疫共陽性反応が認められず, OP 免疫陽性反応が一部の細胞に局限して認められた (図 10d)。深層では, OP および OC 免疫共陽性反応は認められたが, OC 免疫陽性反応と比較して OP 免疫陽性反応がより顕著に認められた (図 10e)。14日目では OP および OC 免疫共陽性反応が3層で全ての細胞に顕著に認められたが, OC 免疫陽性反応と比較して OP 免疫陽性反応がより強く認められた (図 10f,g)。また, 索状構造は認められなかった。

##### 2) 照射遠位部

1日目では OP および OC 免疫共陽性反応は認められなかった (図 11a)。3日目では表層, 中層で OP および OC 免疫共陽性反応は認められず, OP 免疫陽性反応が局限して認められた (図 11b)。深層では, OP および OC 免疫共陽性反応が認められたが, OC 免疫陽性反応と比較して OP 免疫陽性反応が顕著に認めら

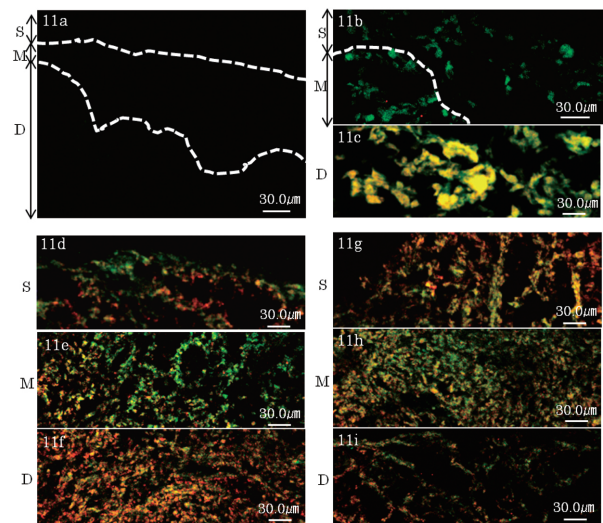


図 11 照射遠位部の OP および OC 免疫二重染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層, (e) 7日目の中層, (f) 7日目の深層, (g) 14日目の表層, (h) 14日目の中層, (i) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

れた (図 11c)。7日目では表層, 中層で OP および OC 免疫共陽性反応が全ての細胞に認められたが, OC 免疫陽性反応と比較して OP 免疫陽性反応がより顕著に認められた (図 11d,e)。深層では OP および OC 免疫共陽性反応が全ての細胞に顕著に認められたが, OP 免疫陽性反応と比較して OC 免疫陽性反応がより顕著に認められた (図 11f)。14日目では OP および OC 免疫共陽性反応が表層, 中層に顕著に認められた (図 11g,h)。深層では OP および OC 免疫共陽性反応が散在的に認められたが, OP 免疫陽性反応と比較して OC 免疫陽性反応がより顕著に認められた (図 11i)。また, 索状構造は3, 7日目に認められた。3日目の表層から中層付近に出現した索状構造は組織像と同様に深層で不明瞭となり, OP および OC 免疫共陽性反応は索状構造を示す部分に認められたが, OC 免疫陽性反応と比較して OP 免疫陽性反応が顕著に認められた (図 13f)。7日目の索状構造は組織像では認められなかったが, OP および OC の免疫染色像では深層付近にまで達していた。索状構造を示す細胞では OP および OC 免疫共陽性反応が認められたが, OC 免疫陽性反応と比較して OP 免疫陽性反応がより顕著に認められた (図 13h)。

##### 3) 照射近位部

1日目では表層, 中層の細胞では OP および OC 免疫共陽性反応は認められず, OP 免疫陽性反応が局限して認められた。深層では, OP および OC 免疫共陽

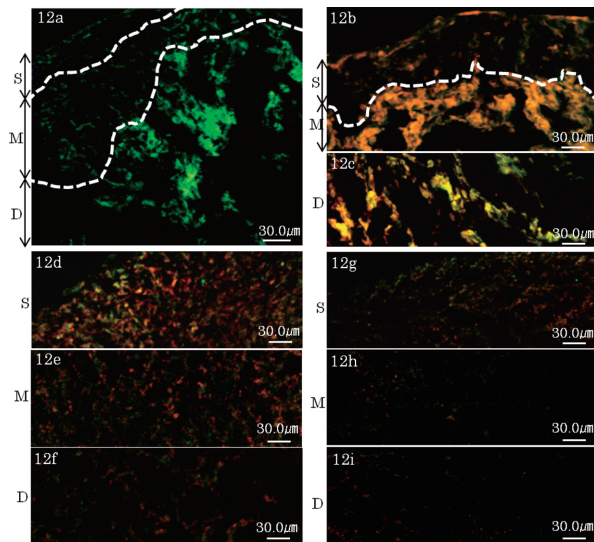


図12 照射近位部のOPおよびOC免疫二重染色像

(a) 1日目の表層から深層, (b) 3日目の表層と中層, (c) 3日目の深層, (d) 7日目の表層, (e) 7日目の中層, (f) 7日目の深層, (g) 14日目の表層, (h) 14日目の中層, (i) 14日目の深層を示す。

(S: 表層 M: 中層 D: 深層)

性反応が認められたが, OC免疫陽性反応と比較してOP免疫陽性反応がより顕著に認められた(図12a)。3日目では表層, 中層ではOPおよびOC免疫共陽性が顕著に認められ, 深層では散在的にOPおよびOC免疫共陽性が認められた(図12b,c)。7日目では, 表層の一部の細胞にOPおよびOC免疫共陽性反応が認められた。中層では, OPおよびOC免疫共陽性反応が散在的に認められたが, OP免疫陽性反応と比較してOC免疫陽性反応がより顕著に認められた(図12d,e)。深層では, OPおよびOC免疫共陽性反応がほとんど認められなかった(図12f)。照射近位部14日目ではOPおよびOC免疫共陽性反応が表層相当部にて散在的に認められたが, OP免疫陽性反応と比較してOC免疫陽性反応がより顕著に認められた(図12g)。中層相当部, 深層相当部ではOPおよびOCの免疫共陽性反応はほとんど認められなかった(図12h,i)。また, 1, 3, 7日目では索状構造が認められた。1日目では組織像と同様に索状構造が表層付近で明瞭に認められたが, 中層, 深層では索状構造は不明瞭であった。1日目の索状構造を示す細胞はOPおよびOC免疫共陽性反応が認められたが, OC免疫陽性反応と比較してOP免疫陽性反応がより顕著に認められた(図13b)。3日目では組織像と同様に多数の明瞭な索状構造が表層から中層付近にまで認められたが, 深層では不明瞭であった。3日目の索状構造を示す細胞と索状

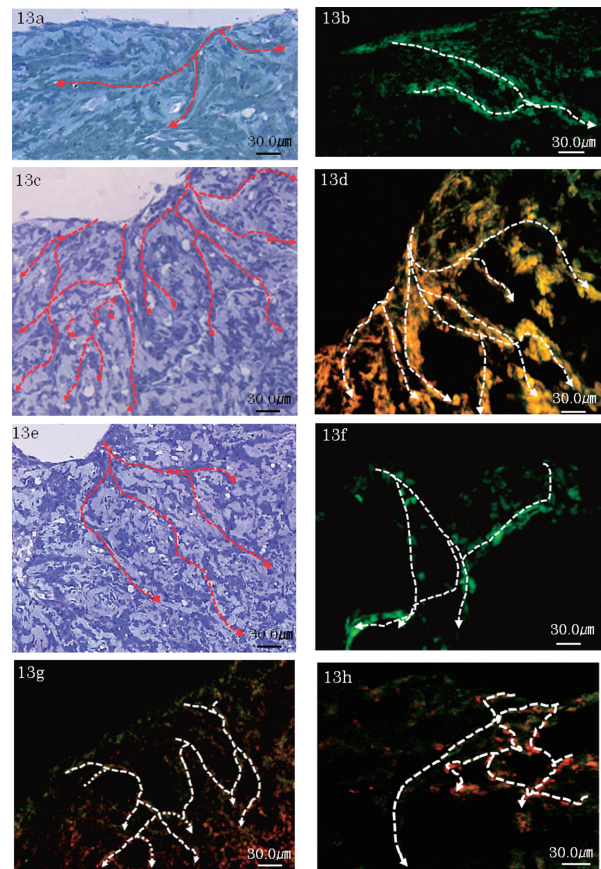


図13 索状構造の組織像および免疫組織化学染色像

(a) 照射近位部1日目のトルイジンブルー染色像, (b) 照射近位部1日目のOPおよびOCの免疫二重染色像, (c) 照射近位部3日目のトルイジンブルー染色像, (d) 照射近位部3日目のOPおよびOCの免疫二重染色像, (e) 照射遠位部3日目のトルイジンブルー染色像, (f) 照射遠位部3日目のOPおよびOCの免疫二重染色像, (g) 照射近位部7日目のOPおよびOCの免疫二重染色像, (h) 照射遠位部7日目のOPおよびOCの免疫二重染色像を示す。

構造付近の細胞はOPおよびOC免疫共陽性反応が顕著に認められた(図13d)。7日目の索状構造は組織像では認められなかったが, OPおよびOCの免疫染色像では索状構造は深層付近まで認められた。7日目の索状構造を構成する細胞とその周囲の細胞にはOPおよびOC免疫共陽性反応が認められたが, OP免疫陽性反応と比較しOC免疫陽性反応がより顕著に認められた(図13g)。

## 考 察

近年, LIPUSを用いた歯周治療への応用を目的とした研究が行われてきており<sup>36,37</sup>, さらに, スフェロイ

ドの形態学的研究も行われている。スフェロイドは組織工学的手法として再生に必要な三要素である足場、細胞、増殖因子<sup>40)</sup>を持ち合わせた理想的な材料として、肝臓の再生や関節軟骨再生に用いられている<sup>41-43)</sup>。また、骨膜は骨芽細胞に分化し骨組織を形成する骨原生細胞を持つことが報告され<sup>44)</sup>、骨膜の採取は自家骨や歯根膜に比較して、患者の負担および外科的侵襲が少ないと考えられている。これらのことから、小野らはHABPCsを用いて、スフェロイド形態と平面培養を比較し、スフェロイド形態がALP、OC、活性型ビタミンD受容体が多く発現したことから、細胞の分化誘導において有用であることを報告している<sup>45)</sup>。また田胡らは、HABPCsを用いたスフェロイドの研究を行い、経時的な細胞小器官の変化とOP、OCの発現の関連性について報告している<sup>46)</sup>。以上の様な研究を元に本研究ではスフェロイドに対してLIPUS照射を行いHABPCsの経時的な細胞の形態変化と細胞分化を明らかにすることを目的として研究を行った。

トルイジンブルー染色像を観察すると、スフェロイド作製後1日目ではコントロール、照射遠位部、照射近位部で、様々な細胞の形状を呈しており、いずれでも、細胞の形態的差異は認められなかったが、経時的に観察すると表層、中層、深層の全層にわたり細胞の形状が扁平形や紡錘形、桿状形などから卵円形を経て球形を呈する変化が認められた。細胞の形状の変化はコントロールでは7日目から14日目、照射遠位部では3日目から7日目、照射近位部では1日目から3日目の間に認められ、その際には表層から深層に向かうに伴い細胞の形状が大型化することが認められた。細胞の形状、大きさによって細胞の活性あるいは分化に差異が生じることは既に知られており、これは、本研究の細胞でも細胞の活性や細胞分化が生じたものと考えられる。

リングを固定装置として利用したスフェロイドを検索した本所見は、無処置のスフェロイドを検索した田胡ら<sup>46)</sup>の所見と差異は認められなかった。従って、今回用いたリングは細胞の形状に影響を与えないものと考えられる。一方、スフェロイド中の細胞の形状や走行、分布密度により3層構造が認められた。層構造はヒト間葉系幹細胞を用いた細胞塊において、細胞塊を構成する細胞の分化が進むにつれ数層の層構造が形成され、最終的には表層および内部に分別されるという報告<sup>47)</sup>があることから、層構造が認められたスフェロイドでは細胞分化が生じたものと考えられる。また、細胞の形状や走行、分布密度による3層構造の出現は照射近位部の方が時期的に早かったが、コントロールで

も3層構造を区別できたことから、LIPUS照射が細胞分化を惹起する事には関係しないものと考えられる。すなわち、細胞分化の惹起はスフェロイドの形状によるものであると考えられ、細胞群を立体的にすることにより、細胞分化が惹起される可能性が示唆された。しかし、3層構造の出現が照射近位部で早かったことは少なくともLIPUS照射は細胞の分化を促進する効果があるものと考えられる。

コントロール、照射遠位部、照射近位部と比較すると顕著なOP免疫陽性反応は、1日目の全層で照射近位部に、3日目の表層、中層で照射近位部に、深層では照射遠位部に認められた。7日目の表層では照射遠位部に、中層、深層ではコントロール、照射遠位部に認められた。14日目の表層、中層ではコントロール、照射遠位部に、深層ではコントロールに認められた。

顕著なOC免疫陽性反応は、OP免疫陽性反応と同様にコントロール、照射遠位部、照射近位部と比較すると、1日目の全層で照射近位部に、3日目の表層、中層で照射近位部に、深層では照射遠位部に認められた。7日目の全層では照射遠位部に、14日目の表層、中層ではコントロール、照射遠位部に、深層ではコントロールに認められた。

OC免疫陽性反応の結果はOP免疫陽性反応の結果と比較すると、OPの発現とOCの発現時期に差異が認められ、OPの発現がより早期であった。OPおよびOC免疫二重染色を施した試料を観察すると、まず、OP免疫陽性反応のみが認められ、続いて、OPおよびOCの両者が陽性を示す時期がある。さらにOP免疫陽性反応が減弱し、OC免疫陽性反応のみが認められた。この結果は骨形成の過程において、まず骨基質タンパク中のOPが形成され、その後、細胞が成熟することでOCの形成が行われるという生化学的な所見と一致する<sup>48-50)</sup>。また、OPおよびOCの発現が、照射近位部に最初に認められ、順に照射遠位部、コントロールで認められることから、LIPUS照射によりスフェロイド内の細胞分化の促進が生じたものと考えられる。

表層から深層に向けて細胞の長軸に向けた細胞の配列である索状構造は、コントロールでは出現せず、LIPUS照射スフェロイドにのみ認められた。このことはLIPUS照射が索状構造形成に何らかの影響を与えている可能性がある。1日目の表層で照射近位部では索状構造が出現し、OPおよびOC免疫陽性反応が認められた。これは、照射遠位部と比較して索状構造の出現時期がより早期であった。特にLIPUS照射3日目の照射近位部では、索状構造の出現とOPおよびOC免疫陽性反応が顕著に認められた。3日目の照射近位部において索状構造を示す細胞と層構造を示す細

胞を比較すると、索状構造を示す細胞やその周囲の細胞は、OP 及び OC 免疫陽性反応がより早期に認められた。すなわち、LIPUS 照射の影響が強い照射近位部において照射遠位部より索状構造が多数出現し、それらを構成する細胞が早期に細胞分化を生じたと考えられる。また、経時的に観察すると、索状構造が1日目では最表層から最表層直下の範囲の中で出現していたのに対し、日数の経過とともに出現範囲が深層付近まで達していることが認められた。これは、索状構造が経時的に範囲を広げていることが考えられる。その後、索状構造は14日目で認められなくなった。索状構造の消失は、スフェロイド全域にて細胞分化が始まり、索状構造を示す細胞との差異がなくなってきたために不明瞭になったと考えられる。このことは、索状構造が LIPUS 照射において特異的に形成され、LIPUS 照射による影響の強さによって、出現数や出現する範囲が変化するものと考えられるが、その詳細は不明である。しかし、LIPUS 照射により生じる可能性がある磁界の影響や細胞接着力の変化により細胞が配向、配置するという報告もあるため<sup>51,52)</sup>、より詳細な検索を行うことで、LIPUS 照射の影響を示す指標の一つになると考えられる。

これまでの結果より、スフェロイドの経時的変化は、細胞が細胞分化を始めたことで細胞形状が変化し、その後、OP の発現を経て OC の発現が生じることが示された。これらの変化は LIPUS 照射の影響を最も多く受けている照射近位部から最初に認められ、照射遠位部、コントロールの順であったため、細胞分化は LIPUS 照射によって促進されると考える。また、細胞の形状の変化や OP および OC の発現が、全てのスフェロイドで深層から表層に向かって生じたことは、三次元構造を有する細胞塊では中心部から分化が生じるという報告<sup>47)</sup>や、低酸素環境下にて骨芽細胞が分化促進するという報告<sup>53)</sup>と一致することから、本研究のスフェロイドの環境も同様であったと考えられる。すなわち、HABPCs を用いて作製したスフェロイドでは、LIPUS 照射は細胞分化が生じる部位に影響しないが分化は促進するものと考えられる。また、三次元構造において同条件の LIPUS を照射すると照射近位部がより早期に細胞分化が生じたことから、細胞分化が LIPUS による刺激の強さによって影響されることが考えられる。以上のことから、同条件で LIPUS を照射した場合、スフェロイド内の細胞に分化を効率よく起こすための条件、つまり、LIPUS を照射したスフェロイド内で深層より細胞分化が生じ、表層に達しているため LIPUS とスフェロイド間の距離の検索が必要である。

本研究で示したように、スフェロイドと LIPUS 照射の併用は細胞分化の促進に有効であることが示唆された。しかしながら、経時的に起こる可能性があるスフェロイド内の細胞壊死の制御、細胞分化を効率よく生じさせる距離やスフェロイド内に出現した索状構造についてはさらに研究を進めていく必要がある。今後、細胞の分化と細胞分化による細胞の形態変化、OP および OC の発現の関係について電子顕微鏡的な検索が必要となる。

## 文 献

- 1) Min BH, Choi BH, Park SR : Low intensity ultrasound as a supporter of cartilage regeneration and its engineering. *Biotechnol and Bioprocess Eng*, 12 : 22-31, 2007.
- 2) 前重伯壮, 荻原信夫, 寺師浩人, 杉元雅晴 : 超音波照射が褥瘡に対して与える影響. *褥瘡会誌*, 10 : 507-512, 2008.
- 3) Soofia N, Noureddeen NA, Mohanmmad F : A clinical trial on the treatment of chronic rhinosinusitis with continuous ultrasound. *J Phys Ther Sci*, 20 : 233-238, 2008.
- 4) Dalecki D : Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng*, 6 : 229-248, 2004.
- 5) Speed CA : Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology*, 40 : 1331-1336, 2001.
- 6) Doan N, Reher P, Meghji S, Harris M : In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg*, 57 : 409-419, 1999.
- 7) Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M : Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine*, 11 : 416-423, 1999.
- 8) Feril LB Jr, Kondo T : Biological effects of low intensity ultrasound : the mechanism involved, and its implications on therapy and on biosafety of ultrasound. *J Radiat Res*, 45 : 479-489, 2004.
- 9) Walker NA, Denegar CR, Preische J : Low intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic field in the treatment of tibial fractures : a systematic review. *J Athl Train*, 42 : 530-535, 2007.
- 10) Chang WH, Sun JS, Chang SP, Lin JC : Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. *Bioelectromagnetics*, 23 : 256-263, 2002.
- 11) 神宮司誠也, 松下 隆 : 骨折に対する低出力超音波パルス治療の基礎と臨床. *メディカルレビュー社*, 大阪, 2008 : 26, 44.

- 12) Haar TG : Therapeutic ultrasound. *Eur J Ultrasound*, 9 : 3-9, 1999.
- 13) Duarte LR : The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop trauma*, 101 : 153-159, 1983.
- 14) Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, Chao EY, Ilstrup DM, Greenleaf JF : Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res*, 12 : 40-47, 1994.
- 15) Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Kilcoyne RF : Acceleration of tibial fracture healing by noninvasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am*, 76 : 26-34, 1994.
- 16) Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ, Roe LR : Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. *J Bone Joint Surg Am*, 79 : 961-973, 1997.
- 17) Erdogan O, Esen E, Ustun Y, Kurkcu M, Akova T, Gönluen G, Uysal H, Cevlik F : Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular fractures : an experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*, 64 : 180-188, 2006.
- 18) 水野耕作, 山野慶樹, 糸満盛憲 : 超音波骨折治療器の遷延癒合・偽関節に対する多施設臨床試験. 整形・災害外科, 46 : 757-765, 2003.
- 19) Nakanishi Y, Wang PL, Ochi M, Nakanishi K, Matsubara H : Low intensity pulsed ultrasound stimulation significantly enhances the promotion of bone formation around dental implants. *J Hard Tissue Biol*, 20 : 139-146, 2011.
- 20) 米田征司, 高木宏太, 伊藤範明, 梶本忠保, 竹内宏, 山本宏治 : 低出力超音波パルス照射のインプラント体表面性状に対する効果. 岐歯学誌, 34 : 64-71, 2007.
- 21) 藤井秀朋 : インプラントの治療期間短縮における超音波刺激療法の有用性. 日本口腔インプラント学会誌, 17 : 183-195, 2004.
- 22) Dimitriou R, Babis GC : Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 7 : 253-265, 2007.
- 23) 神宮寺誠也 : 低出力超音波パルス, *THE BONE*, 18 : 713-717, 2004.
- 24) Tang CH, Lu DY, Tan TW, Fu WM, Yang RS : Ultrasound induces hypoxia-inducible factor-1 activation and inducible nitric-oxide synthase expression through the integrin/ integrin-linked kinase/ Akt/ mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts. *J Biol Chem* 282 : 25406-25415, 2007.
- 25) Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, Tsunoda M, Mizuno K : Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 256 : 284-287, 1999.
- 26) Ito M, Azuma Y, Ohta T, Komoriya K : Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on growth factor secretion in cocultures of osteoblasts and endothelial cells. *Ultrasound Med Biol*, 26 : 161-166, 2000.
- 27) Warden SJ, Favalaro JM, Bennell KL, McMeeken JM, Ng KW, Zajac JD, Wark JD : Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 286 : 443-450, 2001.
- 28) Sant'Anna EF, Leven RM, Viridi AS, Sumner DR : Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *J Orthop Res*, 23 : 646-652, 2005.
- 29) Sena K, Leven RM, Mazhar K, Sumner DR, Viridi AS : Early gene response to low intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol*, 31 : 703-708, 2005.
- 30) Gleizal A, Li S, Pialat JB, Beziat JL : Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low intensity ultrasound : an in vitro study. *Ultrasound Med Biol*, 32 : 1569-1574, 2006.
- 31) Takayama T, Suzuki N, Ikeda K, Shimada T, Suzuki A, Maeno M, Otsuka K, Ito K : Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/ 2.8 cells. *Life Sci*, 80 : 965-971, 2006.
- 32) Arnaud Gleizal, Shuli Li, Jean-Baptiste Pialat, Jean-Luc Beziat : Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low intensity ultrasound : An in vitro study. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 32 : 1569-1574, 2006.
- 33) Naruse K, Mikuni-Takagaki Y, Azuma Y, Ito M, Oota T, Kameyama K, Itoman M : Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun*, 268 : 216-220, 2000.
- 34) 森下恭資, 山本謙吾, 正岡利紀 : 骨芽細胞様細胞株に対する低出力超音波刺激の影響. 東京医科大学雑誌, 61 : 192-203, 2003.
- 35) Inubushi T, Tanaka E, Rego EB, Kitagawa M, Kawazoe A, Ohta A, Okada H, Koolstra JH, Miyauchi M, Takata T, Tanne K : Effects of ultrasound on the proliferation and differentiation of cementoblast lineage cells. *J Periodontol*, 79 : 1984-1990, 2008.
- 36) Ikai H, Tamura T, Watanabe T, Itou M, Sugaya A, Iwabuchi S, Mikuni-Takagaki Y, Deguchi S : Low-intensity pulsed ultrasound accelerates periodontal wound healing after flap surgery. *J Periodontal Res* 43 : 212-216, 2008.

- 37) 眞野壯一郎, 宗正憲和, 岩崎和人, 高橋弘行, 田胡和浩, 川瀬俊夫, 出口眞二: LIPUS 照射による歯周組織由来細胞および間葉系幹細胞の増殖と分化への影響. 神奈川歯学, 46: 37-45, 2011.
- 38) 宗正憲和, 田胡和浩, 光家由紀子, 岩崎和人, 高橋弘行, 川津布美, 東一善, 辻上弘, 菅谷彰, 高橋理, 出口眞二: LIPUS 照射によるスフェロイドの形態学的検索(会議録), 秋季特別 53: 118, 2011.
- 39) Yamauchi N, Yamada O, Takahashi T, Hashizume K: Spheroid formation of bovine endometrial stromal cells with non-adherent culture plate. J Reprod Dev, 47: 165-171, 2001
- 40) Langer R, Vaccanti JP: Tissue engineering. Science, 260: 920-926, 1993.
- 41) Koide N, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M, Matsushima H, Takenami T, Shinji T, Mori M, Tsuji T: Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. Expl Cell Res, 186: 227-235, 1990.
- 42) Jian ZT, Olivier B, Fernando A: Longterm culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. Exp Cell Res, 189: 87-92, 1990.
- 43) 李禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田讓治: 関節軟骨修復・再生を目指した軟骨滑膜混合細胞体の開発. 東日本整災会誌, 22: 207-213, 2010.
- 44) 藤田尚男, 藤田恒夫. 標準組織学 総論 第4版, 医学書院, 東京, 2002, 198.
- 45) 小野智嗣, 宗正憲和, 辻上弘, 岩崎和人, 高橋弘行, 川津布美, 北村綾乃, 根本賢治, 田胡和浩, 菅谷彰, 出口眞二: 三次元培養環境はヒト歯槽骨骨膜由来細胞(HABPCs)の骨芽細胞系への分化を誘導した(会議録). 秋季特別 54: 85, 2012.
- 46) 田胡和浩, 光家由紀子, 東一善, 宗正憲和, 根本賢治, 辻上弘, 菅谷彰, 高橋理, 出口眞二: ヒト歯槽骨骨膜由来細胞凝集塊(スフェロイド)の微細構造学的形態の経時的変化. 日歯周誌, 54: 155-166, 2012.
- 47) 市野瀬志津子, 田上幹樹, 宗田大, 関矢一郎: ヒト間葉幹細胞を用いた軟骨組織の再生. 細胞, 39: 311-315, 2007.
- 48) Lekl'c P, Sodek J, McCulloch CAG: Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. Cell Tissue Res, 285: 491-500, 1996.
- 49) William TB, Helena R: The Nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. Int J Dev Biol, 39: 169-179, 1995.
- 50) Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE: Simultaneous detection of mukiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: Polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. Dev Biol, 166: 220-234, 1994.
- 51) Koibuchi N, Tochinai S: Existence of gradient in cell adhesiveness along the developing Xenopus hind limb bud, shown by a cellular sorting-out experiment in vitro. Dev Growth Differ, 40: 355-362, 1998.
- 52) Eguchi Y, Ogiue-Ikeda M, Ueno S: Control of orientation of rat Schwann cells using an 8-T static magnetic field. Neurosci Lett, 351: 130-132, 2003.
- 53) Hirao M, Hashimoto J, Yamasaki N, Ando W, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa H: Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. J Bone Miner Metab, 25: 266-276, 2007.